第36卷 第4期　　昆 虫 学 报　　Vol. 36, No. 4
1993年11月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Nov., 1993

应用 Percoll 梯度分离粘虫和亚洲玉米螟幼虫主要血细胞的类型*

朱呈智　赵　刚　程振衡
（南开大学生物系，天津　300071）

昆虫血细胞形态多样，变异复杂，不仅给血细胞的分类带来困难，而且还影响对其生理功能的研究（傅贻玲，1982a、1982b）。为了从细胞和分子水平研究各类血细胞的特性和功能，必须制备一定数量的、形态一致的血细胞样品。因此对昆虫各类血细胞分离技术的研究十分重要，但这方面的研究报道还很少（Cook 等，1985；Mead 等，1986）。

本文作者在进行血细胞凝集素表面受体的研究中，利用 Percoll 梯度离心技术从粘虫（*Mythimna separata*）和亚洲玉米螟（*Ostrinia furnacalis*）幼虫的血淋巴中分离出了浆血细胞（plasmatocyte, PL）、颗粒细胞（granulocyte, GR）和球形细胞（spherulocyte, SP）三种主要类型的血细胞。分离出的血细胞形态完整、纯度较高，为进一步进行形态及生物化学方面的比较研究以及研究各类血细胞在昆虫免疫反应中的作用提供了比较理想的血细胞样品。

材 料 和 方 法

昆虫饲养　粘虫按毕富春(1981)配方饲养；亚洲玉米螟按周大荣等(1980)配方饲养。

抗凝剂的制备　基本按 Mead 等（1986）方法配制，但略加修改，添加 1%（V/V）的饱和苯基硫脲。

Percoll 连续梯度的制备　参照 Mead 等(1986)方法并作改动。所有玻璃器皿均在洗液中浸泡过夜，流水冲洗干净后用蒸馏水或无菌水洗数次，高温干燥；塑料器皿则用自来水洗净后再用灭菌水洗涤。50% Percoll 梯度需要抗凝剂 I、Percoll 及水按 1:4.5:4.5 的比例制备。用日本产 Hitachi 20-PR-52D 型自动高速冷冻离心机及 RPR-20-3-706 转头，在 4℃ 2×10^4rpm 离心 22 分钟制备连续梯度。试验了从 30%到 85%的梯度以确定较合适的分离梯度。对照管加 15 微升密度标记珠，其它条件与梯度管相同。

血细胞的分离　取末龄幼虫用蒸馏水洗 2 次后于滤纸上吸干体表水份，剪去一腹足使血淋巴自动滴入含 0.6 毫升抗凝剂 II 的玻管中，二倍稀释后取 1 毫升加于预先制备的 Percoll 梯度上，4℃ 750 rpm 离心 20 分钟。

血细胞的收取　制备 18 厘米长玻璃毛细管，上部内径 3 毫米，下部内径约 0.1 毫米，将此毛细管用二甲基氯化硅“涂硅”后取出各层血细胞进行离心洗涤。

血细胞形态观察　用 Olympus BH-2 显微镜。

结 果 和 讨 论

粘虫和亚洲玉米螟幼虫的血细胞类型已有报道。程振衡(1964)和刘崇乐等(1964)认为粘虫幼虫血

本文于 1992 年 2 月收到。
* 国家自然科学基金资助项目。

细胞可分为 7 或 8 个类型；梁子才等(1991)观察到亚洲玉米螟幼虫的 5 类血细胞。对这两种幼虫各类血细胞的分离研究尚无报道。

在分离研究中，试验了从 30%到 85%的梯度以确定较适宜的 Percoll 密度梯度。对粘虫幼虫血细胞较适宜的分离梯度为 55% Percoll，对亚洲玉米螟幼虫血细胞较适宜的分离梯度为 50% Percoll。在此梯度下，可从两种昆虫的血淋巴中分离出较纯的浆血细胞、颗粒细胞及球形细胞。各类血细胞的纯度见表 1。其中颗粒细胞纯度最高，两种试虫均超过 90%，球形血细胞亦达 88%及 90%，浆血细胞纯度略低，各为 80%和 72%。

在 55% Percoll 梯度下，粘虫幼虫血细胞在离心管中从顶部向下依次为黄色层、凝聚层、颗粒细胞层、浆血细胞层和球形细胞层。黄色层中含有原生质，凝聚层由各类细胞聚集而成。各层位置与对照管中 3 号标记珠(浮力密度为 1.052g/ml) 的位置相比，前 3 层在 3 号珠位置之上，后两层在 3 号珠位置之下。亚洲玉米螟幼虫血细胞在 50% Percoll 梯度中亦形成 5 层，但各层的排列顺序及各层之间的距离与粘虫的不同，在 3 号标记珠位置之上的为黄色层、凝聚层和球形细胞层；而颗粒细胞层和浆血细胞层在 3 号标记珠位置之下。

从离心后的 Percoll 梯度中回收各类血细胞的实验表明，用自制的“涂硅”玻璃毛细管回收效果较好，血细胞的纯度及回收率均较高(见表 1)。

表 1　粘虫和亚洲玉米螟幼虫三种血细胞在分离前后的纯度及回收率

昆　虫	血细胞类型	分离前纯度(%)[a]	分离后纯度(%)[b]	回收率(%)[c]
粘虫	浆血细胞	38	80	53
	颗粒细胞	32	92	
	球形细胞	16	88	
亚洲玉米螟	浆血细胞	30	72	55
	颗粒细胞	36	94	
	球形细胞	8	90	

a. 镜检血淋巴中 500 个血细胞，计算各类细胞的百分含量。
b. 镜检毛细管取出的各层血细胞 500 个，计算各类细胞的百分含量。
c. 从梯度中取出的三类细胞总和与加于梯度上的血细胞总量的百分比值。

由表 1 可知，这三种血细胞约占两种昆虫血细胞总量的 86%及 74%，是主要的血细胞类型；其它类型的血细胞数量较少，梯度离心时，难以形成区带，大部分混于凝聚层内，部分破裂。

在回收血细胞时应特别注意两点：一是毛细管插入梯度之前应排净管内的空气，否则将会破坏已形成的区带界面，影响细胞纯度；二是一些区带很弱，不易看清，毛细管插入的深度应严格控制。

从 Percoll 梯度中取出的各层血细胞用昆虫生理盐水 (130mmol/L NaCl, 2mmol/L KCl, 1mmol/L $CaCl_2$) 离心洗涤数次以除去 Percoll，在洗涤过程中细胞数量损失较多。Mead 等 (1986) 用氯化钠溶液洗涤细胞后其回收率仅为 20—30%。本实验改用上述昆虫生理盐水或 10 倍稀释的抗凝剂 I 号，洗涤后的回收率可达 35% 左右。将洗涤干净的血细胞存于含 1% (V/V) 饱和苯基硫脲的昆虫生理盐水中，8℃短时保存。

参　考　文　献

刘崇乐、傅贻玲　1964　粘虫 *Pseudaletia separata* (Walk) 血细胞的类型辨别和病态变化。昆虫学报 13: 542—

51。
毕富春 1981 粘虫的一种新人工饲料。昆虫学报 24: 379—83。
周大荣等 1980 玉米螟人工繁殖研究 I: 一种半人工饲料及其改进。植物保护学报 7: 113—21。
梁子才、程振衡 1991 亚洲玉米螟幼虫血淋巴的免疫反应。昆虫学报 34: 141—5。
程振衡 1964 粘虫 *Pseudaletia separata* 幼虫期血细胞的相差显微镜观察。昆虫学报 13: 536—41。
傅贻玲 1982a 昆虫的血细胞(一)。昆虫知识 19(3): 45—7。
傅贻玲 1982b 昆虫的血细胞(二)。昆虫知识 19(4): 37—8。
Cook, D. et al. 1985 Purification and preliminary characterization of insect spherulocytes. *Insect Biochem.* 15:419—26.
Mead, G. P. et al. 1986 The separation of insect haemocyte types on percoll gradients, methodology and problems. *J. Insect Physiol.* 32: 167—77.

SEPARATION OF MAIN TYPES OF HEMOCYTES IN *MYTHIMNA SEPARATA* AND *OSTRINIA FURNACALIS* LARVAE BY PERCOLL GRADIENTS

ZHU CHENG-ZHI ZHAO GANG CHENG ZHEN HENG
(*Department of Biology, Nankai University, Tianjin* 300071)